

平成30年6月4日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06980

研究課題名(和文) 精神疾患リスク遺伝子産物の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural Study on Mental Disease Gene Product Protein

研究代表者

雲財 悟 (UNZAI, Satoru)

法政大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60336592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：SynGAP遺伝子は、ヒトの精神疾患リスク遺伝子の代表的なものの1つで、その遺伝子産物蛋白質の具体的な働きや構造、変異型SynGAPがどのような異常を引き起こすかなどの情報は、創薬など精神疾患治療法開発に重要であるため近年注目されている。本研究では、SynGAPおよびパートナー蛋白質のRap1Bを大腸菌発現系で大量に調製し、構造生物学的手法で研究を行った。結果、Rap1Bの結晶構造解析によりその詳細なスイッチ機構の解明に成功した。また、マラカイトグリーン法を利用して、SynGAPによるRap1BのGTPase活性促進を小スケールで測定できる系を確立した。

研究成果の概要(英文)：The brain-specific synaptic GTPase activating protein (SynGAP) is important in synaptic plasticity. Mutations in SYNGAP1 gene cause epileptic encephalopathy, intellectual disability, and autism via haploinsufficiency. Basic research is needed to better understand the molecular functions of the SynGAP protein, which will lead to targets for therapeutic intervention. Structural biology methods were applied for the SynGAP function research. Recombinant SynGAP and Rap1B (SynGAP can enhance Rap1B GTPase activity) were prepared using e-coli expression system. We succeeded in solving high resolution crystal structure of the Rap1B protein and understanding its molecular switch mechanism. We established small volume GTPase activity measurement system using malachite green. Rap1B GTPase activity enhancement by SynGAP can be detected by this system.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

精神疾患患者を対象にした遺伝子解析から、特定の遺伝子変異が精神疾患発症に関与することが示唆されており、それらは「精神疾患リスク遺伝子」と呼ばれている。SynGAP (Synaptic Ras GTPase Activating Protein) 遺伝子は、精神疾患リスク遺伝子の代表的なものの1つである。精神遅滞や自閉症の原因と考えられる変異が、単一の原因遺伝子としては格段に高い割合で SynGAP 遺伝子から見つかっている。タンパク質の具体的な働きや構造、変異型 SynGAP がどのような異常を引き起こすかなどの情報は、創薬など精神疾患治療法開発に重要であるため、近年注目されている。

なぜ SynGAP 遺伝子の異常が精神疾患の原因となるのか。それは、SynGAP タンパク質が脳神経細胞間のシナプス結合調節に決定的に重要な役割を果たしているからである。SynGAP はリン酸化によって活性化され、Rap1b と呼ばれる GTP 結合タンパク質の活性をコントロールしている。結果、その下流に続く細胞内シグナルカスケードの活動を調節している。SynGAP に異常がある場合、この調節機構がうまく働かず、シナプスの可塑性に支障が生じ、結果として精神疾患を引き起こすと考えられている。

2. 研究の目的

SynGAP タンパク質はドラッグターゲットとして注目されており、その具体的な働きや構造、情報伝達タンパク質との具体的な相互作用メカニズムの解明など、構造生物学的手法を利用して得られる情報は、精神疾患発症メカニズム解明に必須である。

Rap1b は単独でも弱い GTPase 活性を持つが、SynGAP と直接相互作用することによってその活性が顕著に高くなる。本研究課題では、SynGAP の複数のドメインが、GTP 結合タンパク質 Rap1b の GTPase 活性をどのように上昇させるのか、構造生物学、生物物理学的手法を用いて解明する。また、将来の創薬開発のために、ハイスループット系に適用できるような Rap1-SynGAP 活性測定系を確立する。

3. 研究の方法

- (1) 精神疾患の原因と考えられている変異型 SynGAP を大腸菌で発現・精製する。Rap1b も同様に大腸菌で発現・精製する。
- (2) Rap1b の GTPase 活性を測定する系を確立する。マラカイトグリーンを利用した遊離リン酸基濃度測定系で、100 μ l 程度の少量で測定できるものを開発する。これは 96 穴プレートリーダー等に適用できる容量であり、将来の創薬開発でハイス

ループット系に使うことを見込んでいる。

- (3) Rap1b の X 線結晶構造解析を行う。Rap1b は GTP 結合型、GDP 結合型の 2 つの異なる立体構造を利用して細胞内シグナルの下流への伝達を ON・OFF するスイッチ機能を果たしている。この機能の詳細な分子メカニズムを解明する。

- (4) SynGAP と Rap1b の相互作用解析を行う。SynGAP は複数のドメインから構成されているため、Rap1b との結合、そして Rap1b の活性コントロールに必要なドメイン部分がどこかを探る。様々な長さの SynGAP を調製し、超遠心分析装置を用いて SynGAP と Rap1b の結合の強さを調べる。

4. 研究成果

- (1) SynGAP、Rap1b の大腸菌での発現・精製に成功した。Rap1b は、GDP 結合型、GTP アナログ物質結合型の調製にも成功した。

- (2) マラカイトグリーン遊離リン酸基測定系を利用して、Rap1b の GTPase 活性を測定できる系を確立した。SynGAP と混合することによって Rap1b の GTPase 活性が飛躍的に高くなることが確かめられた。また、変異型 SynGAP を用いた実験も行った。その結果、SynGAP の GAP domain 中の非常に良く保存されている特定の Arg 残基がやはり重要で、この残基を他のアミノ酸残基に置き換えると SynGAP の Rap1b 活性上昇機能がほぼ無くなることがわかった。またこのアミノ酸残基変異は SynGAP 自体の安定性にも寄与していることがわかった。この情報は共同研究先の SynGAP 遺伝子改変マウス作製のための基礎情報として共有した。

- (3) Rap1b の X 線結晶構造解析に成功した。Rap1b は GTP 結合型、GDP 結合型の 2 つの異なる立体構造を利用して細胞内シグナルの下流への伝達を ON・OFF するスイッチ機能を果たしている。Rap1b の GTP アナログ分子結合型構造、および GDP 結合型構造の両方の解明に成功したので、詳細なスイッチ機構が明らかになった。

- (4) SynGAP (PH-C2-GAP domains) と Rap1b(GTP アナログ結合型)の超遠心分析を用いた相互作用解析を行ったところ、 μ M オーダーのタンパク質濃度では明確な相互作用は観測できなかった。しかしこの SynGAP は Rap1b の GTPase 活性を上昇させることが観測されている。つまり、両者は μ M を切るような Kd で相互作用して活性調節を行っていることがわ

かった。今後、SynGAP の GAP domain よりも C 末端側にあるリン酸化修飾部位が SynGAP と Rap1b との相互作用にどのような影響を与えるか、また多数あるリン酸化修飾部位のそれぞれの役割について実験を行い、考察して行く。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

Unzai S. Analytical ultracentrifugation in structural biology. *Biophys Rev. Springer Berlin Heidelberg*; 2017 Nov 29;401:235–5. DOI: 10.1007/s12551-017-0340-0 (査読有り)

Nawata M, Tsutsumi H, Kobayashi Y, **Unzai S.** Mine S, Nakamura T, Uegaki K, Kamikubo H, Kataoka M, Hamada D. Heat-induced native dimerization prevents amyloid formation by variable domain from immunoglobulin light-chain REI. *FEBS J.* 2017 Sep;284(18):3114–27. DOI: 10.1111/febs.14181 (査読有り)

Jo CH, Son J, Kim S, Oda T, Kim J, Lee M-R, Sato M, Kim HT, **Unzai S.** Park S-Y, Hwang KY. Structural insights into a 20.8-kDa tegumental-allergen-like (TAL) protein from *Clonorchis sinensis*. *Sci Rep.* 2017 May 11;7(1):1764. DOI: 10.1038/s41598-017-02044-0 (査読有り)

Obayashi E, Luna RE, Nagata T, Martin-Marcos P, Hiraishi H, Singh CR, Erzberger JP, Zhang F, Arthanari H, Morris J, Pellarin R, Moore C, Harmon I, Papadopoulos E, Yoshida H, Nasr ML, **Unzai S.** Thompson B, Aube E, Hustak S, Stengel F, Dagraca E, Ananbandam A, Gao P, Urano T, Hinnebusch AG, Wagner G, Asano K. Molecular Landscape of the Ribosome Pre-initiation Complex during mRNA Scanning: Structural Role for eIF3c and Its Control by eIF5. *Cell Rep.* 2017 Mar 14;18(11):2651–63. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.052 (査読有り)

Kasahara K, Higashino A, **Unzai S.** Yoshikawa H, Kokubo T. Oligomerization of Hmo1 mediated by box A is essential for DNA binding in vitro and in vivo. *Genes Cells.* 2016 Dec;21(12):1333–52. DOI: 10.1111/gtc.12449 (査読有り)

Terada D, Kawai F, Noguchi H, **Unzai S.** Hasan I, Fujii Y, Park S-Y, Ozeki Y, Tame

JRH. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types. *Sci Rep.* 2016 Jun 20;6:28344. DOI: 10.1038/srep28344 (査読有り)

Ohki M, Sugiyama K, Kawai F, Tanaka H, Nihei Y, **Unzai S.** Takebe M, Matsunaga S, Adachi S-I, Shibayama N, Zhou Z, Koyama R, Ikegaya Y, Takahashi T, Tame JRH, Iseki M, Park S-Y. Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jun 14;113(24):6659–64. DOI: 10.1073/pnas.1517520113 (査読有り)

Kobayashi N, Yanase K, Sato T, **Unzai S.** Hecht MH, Arai R. Self-Assembling Nano-Architectures Created from a Protein Nano-Building Block Using an Intermolecularly Folded Dimeric de Novo Protein. *J Am Chem Soc.* 2015 Sep 9;137(35):11285–93. DOI: 10.1021/jacs.5b03593 (査読有り)

Yoshida H, Park S-Y, Oda T, Akiyoshi T, Sato M, Shirouzu M, Tsuda K, Kuwasako K, **Unzai S.** Muto Y, Urano T, Obayashi E. A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. *Genes Dev.* 2015 Aug 1;29(15):1649–60. DOI: 10.1101/gad.267104.115 (査読有り)

Noguchi H, Ikegami T, Nagadoi A, Kamatari YO, Park S-Y, Tame JRH, **Unzai S.** The structure and conformational switching of Rap1B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jun 19;462(1):46–51. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.103 (査読有り)

Miyatake H, Sanjoh A, **Unzai S.** Matsuda G, Tatsumi Y, Miyamoto Y, Dohmae N, Aida Y. Crystal Structure of Human Importin- α 1 (Rch1), Revealing a Potential Autoinhibition Mode Involving Homodimerization. Eberini I, editor. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0115995. DOI: 10.1371/journal.pone.0115995 (査読有り)

Zhao H, et al., (other 118 authors. **Satoru Unzai**, 107 番目) . A multilaboratory comparison of calibration accuracy and the performance of external references in analytical ultracentrifugation. Langowski J, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science;* 2015;10(5):e0126420. DOI: 10.1371/journal.pone.0126420 (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

Antonio Tsuneshige, **Satoru Unzai**,
Disassembly and Impact on Function of a
Multimeric Allosteric Protein by
Kosmotropes. (ポスター発表) 第 55 回日
本生物物理学会年会 2017 年 9 月 19 日～
21 日、熊本大学、熊本

Kazuki Kiuchi, Kohta Sugiyama, Ryotaro
Kishi, **Satoru Unzai**, Hidetaka Torigoe.
Molecular mechanism of the triplex
DNA-binding protein to recognize triplex
DNA. (ポスター発表) 第 54 回日本生物
物理学会年会 2016 年 11 月 25 日～27 日、
つくば国際会議場、つくば

Marina Nawata, Hirotaka Tsutsumi, Yuta
Kobayashi, **Satoru Unzai**, Souhei Mine,
Tutomu Nakamura, Koichi Uegaki, Hironari
Kamikubo, Mikio Kataoka, Daizo Hamada.
Role of dimerization by immunoglobulin
light chain variable domain for inhibition of
amyloid formation. (ポスター発表) 第 16
回日本蛋白質科学会年会 2016 年 6 月 7
日～9 日、福岡国際会議場、福岡

Hiroki Noguchi, Sam-Yong Park, Jeremy
Tame, **Satoru Unzai**. The structure and
conformational switching of Rap1B. (ポス
ター発表) 第 53 回日本生物物理学会年会
2015 年 9 月 13 日～15 日、金沢大学、金
沢

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

雲財 悟 (UNZAI, Satoru)
法政大学・生命科学部・准教授
研究者番号 : 60336592

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号 :

(3) 連携研究者

朴 三用 (PARK, Sam-Yong)
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授
研究者番号 : 20291932

(4) 研究協力者

小見山 上 (KOMIYAMA, Noboru)
The University of Edinburgh, Centre for